

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

13. 9. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 9 月 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 1 7 3 7 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 3 1 7 3 7 9]

出 願 人 学 校 法 人 慶 應 義 塾
Applicant(s):

REC'D 04 NOV 2004

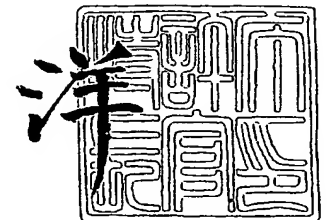
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 2 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 4 8 8 0

【書類名】 特許願
【整理番号】 C0030412
【提出日】 平成15年 9月 9日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内
 【氏名】 岡野 栄之
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内
 【氏名】 岡野 ジェームス 洋尚
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内
 【氏名】 坂口 昌徳
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都文京区湯島 1 丁目 5 番 4 5 号 東京医科歯科大学大学院医
 歯学総合研究科内
 【氏名】 水澤 英洋
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都文京区湯島 1 丁目 5 番 4 5 号 東京医科歯科大学大学院医
 歯学総合研究科内
 【氏名】 石橋 哲
【特許出願人】
 【識別番号】 899000079
 【氏名又は名称】 学校法人 慶應義塾
【代理人】
 【識別番号】 110000176
 【氏名又は名称】 一色国際特許業務法人
 【代表者】 一色 健輔
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 211868
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

培養液中の神経幹細胞の生存、増殖、またはそれら両方を促進する方法であって、ガレクチン-1 (Galectin-1) を前記神経幹細胞内で過剰発現させるステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

培養液中の神経幹細胞の生存、増殖、またはそれら両方を促進する方法であって、前記神経幹細胞を、ガレクチン-1 を含有した培養液で培養することを特徴とする方法。

【請求項 3】

培養液中の神経幹細胞の生存、増殖、またはそれら両方を促進する方法であって、前記神経幹細胞を、ガレクチン-3 を含有した培養液で培養することを特徴とする方法。

【請求項 4】

前記培養液がニューロスフィア培養上清を含有することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記培養液が、OP9 細胞株の培養上清を含有することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

ガレクチン-1 を過剰発現させた神経幹細胞を有効成分として含有し、脳内虚血によって障害が生じた高次機能を改善することを特徴とする医薬組成物。

【請求項 7】

前記高次機能が運動機能であることを特徴とする請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

ヒト以外の哺乳動物において、ガレクチン-1 を過剰発現させた神経幹細胞を移植することによって、脳虚血に由来する症状を改善する脳虚血治療方法。

【請求項 9】

神経幹細胞が分化する際の神経突起伸長を促進する方法であって、ガレクチン-1 を前記神経幹細胞内で過剰発現させるステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 10】

前記ガレクチン-1 が、C-S 変異型ガレクチン-1 であることを特徴とする請求項 1、2、4、5、8、9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記ガレクチン-1 が、C-S 変異型ガレクチン-1 であることを特徴とする請求項 6 または 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記ガレクチン-3 が、C-S 変異型ガレクチン-3 であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】神経幹細胞の生存及び／又は増殖及び神経突起伸張を促進する方法並びに神経幹細胞を含む医薬組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経幹細胞の生存及び／又は増殖及び神経突起伸張を促進する方法並びに神経幹細胞を含む医薬組成物、に関する。

【背景技術】

【0002】

障害を起こした中枢神経系の再生は困難であるが、動物実験では胎児組織、特に神経幹細胞の移植が有用であることが報告されている。しかし、治療に十分な神経幹細胞を得るには多数の中絶胎児の献体を必要とする上に、胎児の使用に倫理面での問題があるため、現実的な臨床応用は難しい。

【0003】

そこで、胎児から直接単離した神経幹細胞に代わる移植材料の候補として、体外で培養し、増殖させた神経幹細胞が注目されている。神経幹細胞は自己複製能と多分化能を有する未分化な細胞であり、体外で培養することにより無尽蔵に増殖するため、十分なドナー細胞の供給が可能である。

【0004】

神経幹細胞の体外増殖法は、Weissらの報告したニューロスフィア法（例えば、非特許文献1参照）が一般的であり、ニューロスフェア法を用いて増殖させた神経幹細胞を、特に脳虚血、神経変性疾患等の難治性疾患への移植することで、多くの治療成功例が報告されている（例えば、非特許文献2参照）。

【非特許文献1】サイエンス（Science）（米国）1992年255巻 p.1707-1710

【非特許文献2】ネイチャー（Nature）（英国）2003年422巻 p.688-694

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

ニューロスフィア法によると、神経幹細胞を体外で増殖させることができるが、この培養条件では、神経幹細胞の1つの特徴として、他の細胞に比べ、細胞の増殖速度が非常に遅いことがある。従って、実際の移植に使用する数の神経幹細胞を得るには、増殖速度を改善する必要がある。また、移植した神経幹細胞が患者体内で神経に分化し機能するためには、神経突起伸張が良いほど好ましい。

【0006】

そこで、本発明は、神経幹細胞の生存及び／又は増殖を促進する方法、その方法によって作製された神経幹細胞を含む医薬組成物、並びに神経幹細胞を分化誘導する際の神経突起伸長を促進する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明者らは、OP9細胞株の培養上清及びニューロスフェアの培養上清（以下それぞれ、OP9 CM、NSF-CM）と称する）に、神経幹細胞の低密度での生存及び増殖を維持する活性があることを見いだした。そこで、定量性質量分析計（CIPHERGEN社製Protein chip）を用いて、活性のあるOP9 CMと活性の無いOP9 CMを比較（N=4）し、培養上清中で発現差のある分子の分子量リストを作成した。そのリストの内最も再現性の高かった一つを選択し、二重マススペック（ABI社製Q star）を用いて、断片アミノ酸配列を決定したところ、ガレクチン-1であることが判明した。

【0008】

ガレクチン-1は β -ガラクトシドに結合するレクチンであって、細胞質内及び細胞外

の両方に存在することが知られている。ウエスタン・ブロットによりOP9CM及びNSF-CM中のガレクチン-1の発現を調べたところ、確かにこれらの培養上清中にガレクチン-1が検出された。そこで、ガレクチン-1のアンチセンスRNAを強制発現することによりガレクチン-1活性を阻害したところ、神経幹細胞の増殖が著しく抑制を受けた。また、糖結合に対する競合作用によりガレクチン-1の阻害活性を有するThiodigalactoside (10 mM) をNSF-CMに添加すると、神経幹細胞の低密度での生存及び増殖を維持する活性が阻害された。

【0009】

これらの結果は、OP9CM及びNSF-CM中の上記活性が、ガレクチン-1の糖結合活性に由来することを示唆する。このガレクチン-1を神経幹細胞で過剰発現させるか、またはガレクチン-1を神経幹細胞を培養する培地中に添加することにより、神経幹細胞の生存率及び/又は増殖率を促進できることが明らかとなり、本発明の完成に至った。

【0010】

こうして完成された本発明において、培養液中の神経幹細胞の生存、増殖、またはそれら両方を促進する方法は、ガレクチン-1を神経幹細胞内で過剰発現させるステップを含むことを特徴とする。別の実施態様として、神経幹細胞を、ガレクチン-1またはガレクチン-3を含有した培養液で培養することを特徴としてもよい。

【0011】

なお、本明細書中で、単にガレクチン-1 (又は-3) と呼んだ時は野生型ガレクチン-1 (又は-3) 及び β ガラクトシド結合活性を有する変異型ガレクチン-1 (又は-3) の両方を含むものとする。

【0012】

これら実施態様において、培養液がニューロスフィア培養上清又はOP9細胞の培養上清を含んでもよい。また、ガレクチン-1がこれらの培養上清に由来してもよい。

【0013】

さらに、本発明に係る医薬組成物は、ガレクチン-1を過剰発現させた神経幹細胞を有効成分として含有し、脳内虚血によって障害が生じた高次機能を改善することを特徴とする。また、高次機能が運動機能であってもよい。

【0014】

さらに、本発明に係る治療方法は、ヒト以外の哺乳動物において、ガレクチン-1を強制発現させた神経幹細胞を移植することによって、脳虚血に由来する症状を改善するものである。症状としては、例えば、高次機能障害、特に運動機能障害であることが考えられる。治療対象は、ヒトにも適用可能である。

【0015】

さらに、本発明に係る、in vitroで神経幹細胞を分化誘導する際の神経突起伸長を促進する方法は、ガレクチン-1を前記神経幹細胞内で過剰発現させるステップを含む。

【0016】

なお、上記ガレクチン (ガレクチン-1及びガレクチン-3の両方を含む) は、C-S変異型ガレクチンでもよい。C-S変異型ガレクチンとは、本明細書中では、ガレクチンの有するシステイン残基のうち、少なくとも1つのシステイン残基がセリン残基に変異している変異ガレクチンタンパク質をいう。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、神経幹細胞の生存及び/又は増殖を促進する方法、及びその方法によって作製された神経幹細胞を含む医薬組成物を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (3rd edition), Cold

Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd. などの標準的なプロトコル集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコルを用いる。

【0019】

なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

【0020】

本発明は、培養液中の神経幹細胞の生存、増殖、またはそれら両方を促進する方法であって、ガレクチン-1を前記神経幹細胞内で過剰発現させるステップを含むことを特徴とする。

【0021】

適用する神経幹細胞は、Weissのニューロスフィア法あるいはそれを改良した方法を用いて単離する。神経幹細胞の由来する動物種や中枢神経系内での部位、神経幹細胞の発生段階は特に限定しないが、以下の実施例では、マウス14日胚前脳より単離した神経幹細胞を用いた。

【0022】

ガレクチン-1を過剰発現させる方法としては、神経幹細胞で機能する転写プロモーターを有したウイルスベクターやプラスミドベクターを用いて、ガレクチン-1遺伝子を外来的に神経幹細胞に導入し、強制発現させてもよい。導入方法は、常法に従って、細胞にトランスフェクトしてもよいし、ベクターにウイルスベクターを用いる場合などは、予めベクターを含んだウイルス粒子を形成させ、そのウイルスを細胞に感染させてもよい。ウイルスとしては、ガレクチン-1遺伝子を神経幹細胞に導入し、ガレクチン-1を強制発現できるものであれば何でもよく、例えばアデノウイルスやレトロウイルスなどが使用できる。外来性遺伝子ではなく、内在性ガレクチン-1遺伝子座に対し、遺伝子操作を行い、過剰発現するようにしてもよい。その方法としては、例えば、相同組換えによって、内在性ガレクチン-1遺伝子座のプロモーター領域を、恒常的に発現する遺伝子のプロモーター領域などで置換したり、恒常的に発現する遺伝子の構造遺伝子部分をガレクチン-1遺伝子で置換したりすること等が考えられる。

【0023】

また、別の実施形態として、ガレクチン-1またはガレクチン-3を、神経幹細胞を培養する培地中に添加してもよい。この場合、添加するガレクチン-1またはガレクチン-3の濃度は、100 pg/ml以上が好ましく、100 ng/ml以上がより好ましい。

【0024】

精製したガレクチン-1を添加する代わりに、ガレクチン-1を含有した培地を添加してもよい。例えば、OP9細胞株や神経幹細胞の培養上清や、ガレクチン-1を適当な細胞株（例えばCOS細胞株や293T細胞株など）で強制発現させ、その培養上清を用いてもよい。

【0025】

上記のようにして得られた、ガレクチン-1を過剰発現させた神経幹細胞を、脳内虚血による症状、特に障害が生じた高次機能を改善するための治療薬として用いることができる。脳内虚血によって障害の生じる高次機能として、運動機能・感覚機能・認識機能が知られているが、以下の実施例では、運動機能を例にとって、機能改善を測定した。

【0026】

神経幹細胞を移植する際には、バッファーやキャリアなどとともに形成した医薬組成物を移植するのが好ましい。以下の実施例で示すように、通常の神経幹細胞を移植するのに比べ、ガレクチン-1を過剰発現させた神経幹細胞を移植した場合、症状の改善の効果が、より著しいことがわかる。

【0027】

神経幹細胞の移植の際、ガレクチン-1を脳内に投与する別の方法として、ガレクチン-1を過剰発現させた神経幹細胞を移植するのではなく、神経幹細胞の移植とともに、ガレクチン-1を脳内に直接投与するか、または静注により血中投与しても良い。

【0028】

野生型ガレクチン-1は、還元剤（例えば β -メルカプトエタノール）非存在下で24時間以内に β -ガラクトシド結合活性を失うが、C-S変異型ガレクチン-1（例えば、C2S、C16S、C42S、C60S、C88S、C130Sの各変異ガレクチン-1）は1週間以上その活性を保つことから、システイン残基が還元状態にあることが糖結合活性を安定に保つのに重要であることが示された（Hirabayashi and Kasai, J Biol Chem 268, 23648-23653）。このように、C-S変異型ガレクチンは、野生型ガレクチンと同じ β -ガラクトシド結合活性を有するばかりでなく、非還元状態において、野生型ガレクチンより、長期にわたって安定に活性を保つことができる。従って、本発明のいずれにおいても、上記野生型ガレクチンの代わりにC-S変異型ガレクチンを用いてもよい。C-S変異型ガレクチン-1の場合、中でもC2S型変異体は非還元状態で最も安定であり（Hirabayashi and Kasai, J Biol Chem 268, 23648-23653）、特に好ましい変異体である。また、C-S変異型ガレクチンは、複数のシステイン残基がセリン残基と置換していてもよい。なお、これらの変異型タンパク質は、常法により、ガレクチン遺伝子に対してin vitro mutagenesisの方法を用いて得られた変異遺伝子が大腸菌で発現させ、精製することにより得られうる（Hirabayashi and Kasai, J Biol Chem 268, 23648-23653）。

【0029】

以下、実施例を用いて、以上に説明した実施態様を具体的に説明するが、これは、実施の一例であって、本発明をこの実施例に限定するものではない。

【実施例1】

【0030】

<ニューロスフィアの作成>

妊娠14日目マウス子宮より、マウス14日胚を剖出し、側脳室周囲部を単離し、ピペットを用いて単一細胞に物理的に解離した。表1の培養液中で、一週間37℃5%で培養すると、約50-200 μ m程度の球状の浮遊性細胞塊が得られた。

【表 1】

	/L	製造者および型式
DMEM/F12 1:1	1.56g	GIBC012400-016
NaHCO3	1.2g (14mM)	Nacalai
Glucose	2.9g	Nacalai
Transferrin	100mg	和光208-10333
Insulin	25mg	SIGMA I-5500
Progesterone	6.3ug	SIGMA P-0130
Sodium Selenate	5.2ug	SIGMA S-1382
Putrescine	9.7mg	SIGMA P-7505
EGF	40ug	Genzyme Tech
bFGF	40ug	Genzyme Tech

【0031】

この細胞塊を、再び単一細胞に物理的に解離し、セルソーターを用いて、新たに調製した培地中に1~100細胞/ウエルの細胞密度でソーティングを行った。その際、実験誤差を少なくするため、厳密にソーティングする細胞の大きさを10~25 μ mとし、かつ死細胞をPI染色法により染色し除去した。その後、さらに7日間培養し、形成されるニューロスフィア(50 μ m以上の細胞塊として定義)の数を測定し、形成効率とした。このアッセイ系におけるニューロスフィアの形成効率を、神経幹細胞の生存及び/又は増殖の指標とした。

【0032】

この方法に従ってソーティングした後、表1の培養液のみではニューロスフィアは形成されなかった。しかしながら、培養液中にニューロスフィア培養上清またはOP9CMを添加することにより、ソーティング後のニューロスフィアの形成が可能となった。

【0033】

OP9CMは以下のようにして調製できる。通常20%FCSを含む α MEMで継代されているOP9細胞に対し、PBSで数回洗い、表1の培地を添加して、48時間37℃5%CO₂の条件下で培養する。その後、0.45 μ mのフィルターで細胞成分を除去し、培養上清OP9CMとする。

【実施例2】

【0034】

<ガレクチン-1の強制発現>

レトロウイルス発現ベクターGCDNsamIRES-EGFPに、マウス・ガレクチン-1 cDNA全長配列をクローニングした(GAL)。以下、ネガティブコントロールとして、ベクターのみのもの(RV)、及びガレクチン-1 cDNAを逆向きに挿入したもの(AS)を用いた。これらのレトロウイルスベクターとVSV-G発現プラスミドを、それぞれレトロウイルス産生細胞株293gpにトランスフェクトした。その後48時間培養し、各上清をレトロウイルス含有培地として回収した。実施例1に従ってニューロスフィアを培養する際、培養液中にレトロウイルス含有培地を添加し、感染の成立したニューロスフィア細胞のみを、セルソーターを用いてソーティングした。なお、ソーティングの際には、希釈なしのニューロスフィア培養上清を用いた。この培養上清は、ニューロスフィア形成時の培養条件にて72時間培養の後に、0.45 μ mフィルターを通して細胞成分を除去することにより調製

した。

【0035】

その後7日目に形成されたニューロスフィアの形成効率（ニューロスフィアの数／ソートされた神経幹細胞の数）を、GAL、RV、ASの間で比較した。図1に示すように、RV（コントロール）5.58%、GAL（ガレクチン-1強制発現群）7.78%（有意水準 $p=0.002$ ）、AS（ガレクチン-1アンチセンス強制発現群）3.9%（有意水準 $p=0.005$ ）となり、ガレクチン-1の強制発現は、神経幹細胞の生存及び／又は増殖を促進した。

【実施例3】

【0036】

<培地中へのガレクチン-1またはガレクチン-3の添加>

実施例1のソーティング後の培地中にヒト組換えガレクチン-1 (Genzyme technology 社)を100pg/ml、1ng/ml、100ng/mlにて添加した。結果を図2に示す。なお、本実験では、ソーティング後の培養培地としては、約66%に希釈したニューロスフィア培養上清を用いた。

【0037】

結果として、独立試行を3回行い、図2に示すように、ネガティブコントロール 0.13%、ガレクチン-1 100pg/ml添加時0.23%、ガレクチン-1 1ng/ml添加時0.23%、ガレクチン-1 100ng/ml添加時1.9%となり、ガレクチン-1 100pg/ml又は1ng/ml添加により、ニューロスフィアの形成効率は上昇したが、100ng/ml添加により、最も著しくニューロスフィアの形成効率は上昇し、ガレクチン-1は、濃度依存的に神経幹細胞の生存及び／又は増殖を促進した。

【0038】

さらに、ガレクチン-1との代わりにガレクチン-3を用いて、100ng/mlにて実験を行った（N=5）。本実験では、培養の基礎培地として、希釈なしのニューロスフィア培養上清を用いた。図3に示すように、ガレクチン-1添加時 3.75%、ガレクチン-3添加時3.52%となり、ガレクチン-3もガレクチン-1と同等の効果があつた。

【実施例4】

【0039】

<モデル動物を用いた実験>

==スナネズミの虚血誘導==

16~21週齢で体重60~76gのスナネズミ (Meriones unguiculatus) を3匹または4匹のグループに分け、12時間の明暗サイクルで飼育した。スナネズミを二群に分け、2%イソフルレンを用いて麻酔し、左側の頸動脈を小ピンチコックで10分間狭窄し、虚血を誘導した。

【0040】

脳梗塞の症状は梗塞指標 (stroke index: SI) で評価した。即ち、以下の行動あるいは状態に対し、それぞれ下記の点数を与え、当てはまる症状の点数を合計する。

毛の逆立てまたは振戦	1
感覚の鈍化	1
動作の減少	1
反り返った頭部	3
閉じない目	3
眼瞼下垂	1
外向きに広げた脚	3
回旋運動	3
発作	3
高度の筋力低下	6

虚血誘導した個体群のうち、10以上の点数を有した個体を選択し、一度目の虚血誘導の5時間後に、もう一度同様の虚血誘導の操作を行い、以下の移植実験に用いた。

【0041】

==神経幹細胞の移植==

スナネズミに虚血誘導操作を行った4日後に、以下のように移植手術を行った。スナネズミを2%イソフルレンを用いて麻酔し、定位フレーム内に置く。虚血を誘導したのと同じ左側の頭蓋骨に、頭蓋骨を平面にしたときのブレグマからの座標（前方約1.0mm、側方約1.5mm、腹方約1.5mm）にある線条体の尾状核に10 μ lのハミルトンシリンジが挿入できる程度の穴を開ける。ハミルトンシリンジを用いて、2分以上かけて移植用懸濁液（5 \times 10⁵細胞数/3 μ l）を3 μ l注入し、2分放置して、拡散させることにより、尾状核に神経幹細胞を移植した。実験に供する二群に対して、実施例2で作製した、ウイルスベクター（RV）のみを有する神経幹細胞、及びガレクチン-1（GAL）を有する神経幹細胞を、それぞれ移植した。なお、各神経幹細胞に対し、移植前に遺伝子導入を計2回行い、合計21日間培養した。拒絶反応を抑制するため、各個体群に対し、手術後4週間、週に3回ミグリオール812（ミツバ貿易）を混合したシクロスポリンA（和光製薬）を投与した。手術後は、摂餌、グルーミング、体重の増加が正常に回復するまでケージに一匹ずつ飼育した。

【0042】

==EBST (elevated body swing test) ==

実験に用いたスナネズミの運動機能を評価するために、EBSTを行った。各スナネズミ個体を、尾の付け根で保持し、実験台から約10センチの高さに持ち上げた。左右どちらかの側に10度以上上半身を持ち上げたとき、その側へのスイングと定義する。一分間のスイングの方向と回数を測定し、これを毎日3回（合計3分）繰り返した。ここでは、左側の脳に虚血誘導を起こさせているので、その反対側、即ち右側にスイングする割合が計測された。

【0043】

虚血誘導操作をした日、神経系前駆細胞を移植した日、及び、移植後10日目、20日目、30日目に、EBSTを行った。図4に示したように、ガレクチン-1（GAL）を有する神経幹細胞を用いると、ウイルスベクター（RV）のみを有する神経幹細胞に比べ、さらに運動機能障害の回復が観察された。

【実施例5】

【0044】

<中枢神経突起伸長効果>

実施例2で作製した、マウス・ガレクチン-1 cDNAを組み込んだレトロウイルスベクターGCDNsamIRES-EGFPを有する神経幹細胞を、培養培地から増殖因子EGF及びFGFを除去して接着培養を行うことにより、ニューロンを分化させた。分化した細胞を、ニューロンの特異的マーカーである β III-チューブリンで染色したところ、図5に示すように、ガレクチン-1を発現する神経幹細胞が分化した神経細胞は、コントロールである無処理の神経幹細胞が分化した神経細胞に比べ、顕著に伸張した神経突起を有することがわかった。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】本発明に係る実施例2において、神経幹細胞内でガレクチン-1を強制発現させた時のニューロスフィアの形成効率を、コントロールと共に表したグラフである。

【図2】本発明に係る実施例3において、神経幹細胞の培養液中にガレクチン-1を添加した時のニューロスフィアの形成効率を、コントロールと共に表したグラフである。

【図3】本発明に係る実施例3において、神経幹細胞の培養液中にガレクチン-3を添加した時のニューロスフィアの形成効率を、ガレクチン-1を添加した時のニューロスフィアの形成効率と比較したグラフである。

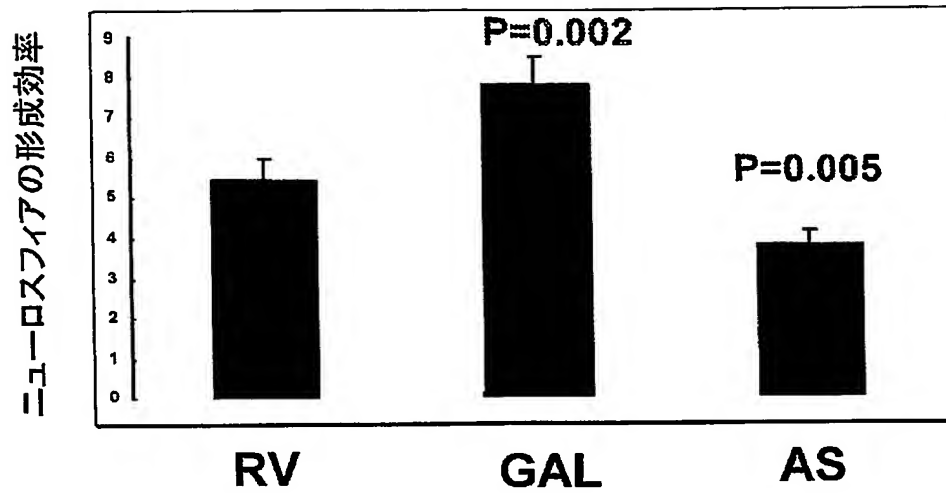
【図4】本発明に係る実施例4において、ガレクチン-1を強制発現させた神経幹細胞

胞を虚血誘導したスナネズミに移植した後、EBSTを行った結果を、コントロールと共に示したグラフである。

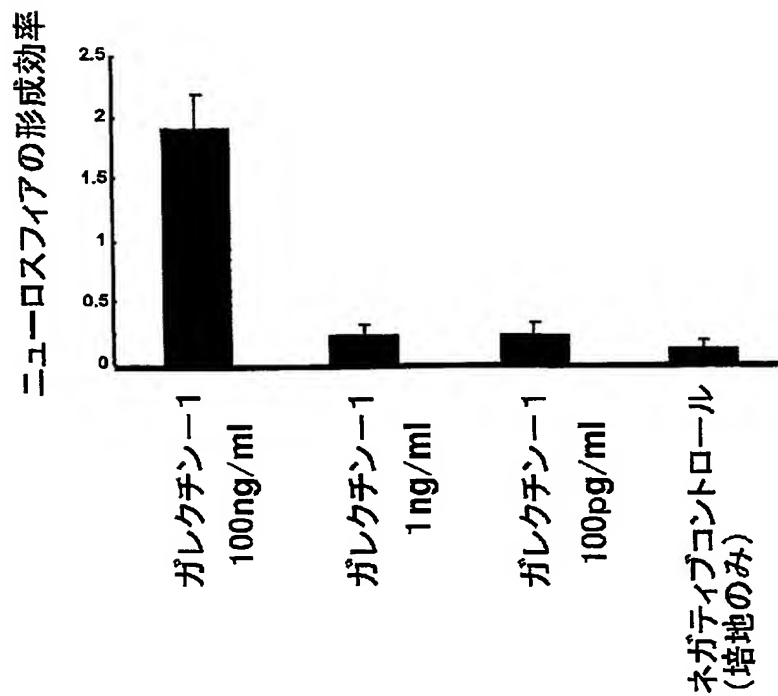
【図5】本発明に係る実施例5において、無処理の神経幹細胞（A）及びガレクチン-1を強制発現させた神経幹細胞（B）を分化させ、抗 β III-チューブリン抗体を用いて抗体染色した写真である。矢印は伸張した神経突起を示す。

【書類名】 図面

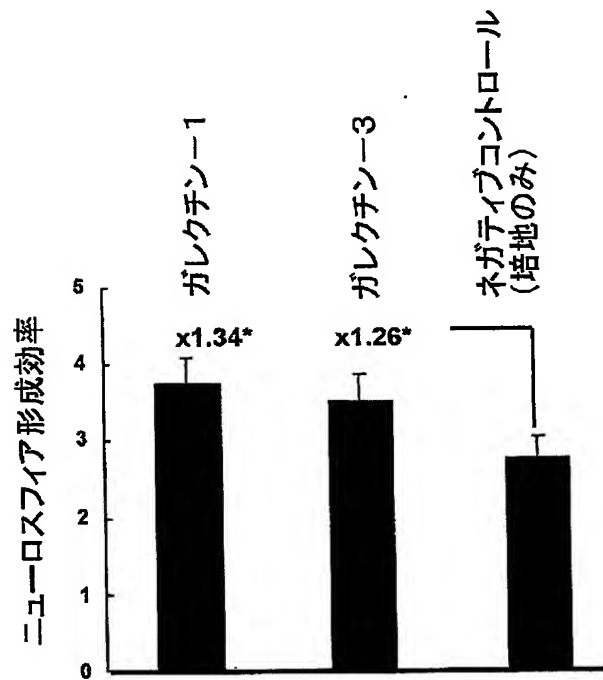
【図 1】



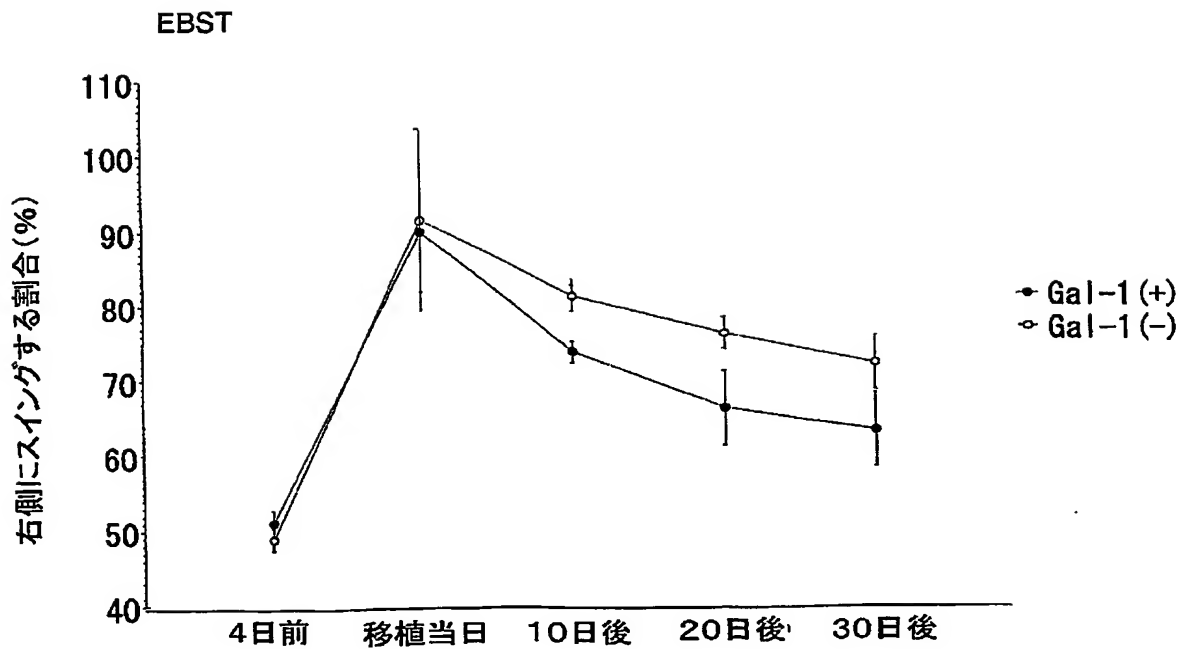
【図 2】



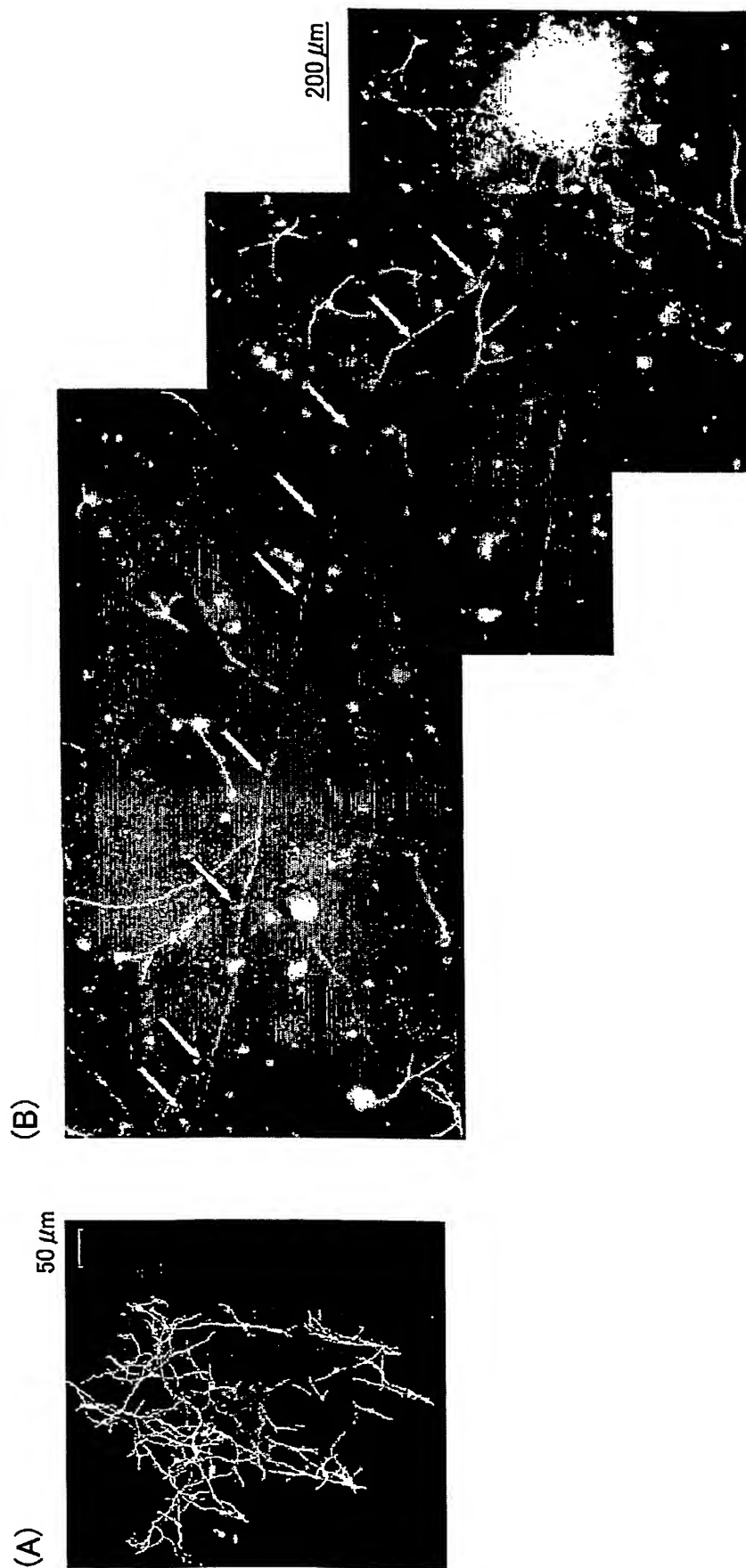
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 神経幹細胞の生存及び／又は増殖を促進する方法、及びその方法によって作製された神経幹細胞を含む医薬組成物を提供する。

【解決手段】 ガレクチン-1 を神経幹細胞内で過剰発現させるか、またはガレクチン-1 を含有した培養液で神経幹細胞を培養する。この方法で作製された、ガレクチン-1 を過剰発現する神経幹細胞を含む医薬組成物は、脳内虚血によって障害が生じた高次機能を改善する。

特願 2 0 0 3 - 3 1 7 3 7 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[8 9 9 0 0 0 0 7 9]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

1 9 9 9 年 9 月 1 7 日
新規登録
東京都港区三田2丁目15番45号
学校法人慶應義塾

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.